

植物脂质转运蛋白的研究进展*

张明永 梁承邺

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 高等植物脂质转运蛋白 (lipid transfer proteins, LTP) 是一类小分子 (约 9 ku) 的碱性蛋白质, 已从多种植物中纯化出了 LTP, 且编码 LTP 的 cDNA 及基因也从不同植物中克隆。LTP 能够在生物膜之间转运磷脂, 因而认为 LTP 参与了细胞内生物膜形成。而近期的研究又发现 LTP 具信号肽, 可从细胞内分泌到细胞外, 位于细胞壁上, 因而又对其在细胞内的转运脂质能力产生疑问。而有证据表明 LTP 参与了角质与腊质的形成、植物的抗病反应和植物对环境变化 (温度、盐、干旱胁迫) 的适应。

关键词 脂质转运蛋白, 脂质, 植物

学科分类号 Q71

高等植物叶片中脂质 (lipid) 的合成有两条途径, 一条是在质体内的原核途径 (prokaryotic pathway), 另一条是主要在内质网中进行的真核途径 (eukaryotic pathway)^[1], 而植物体内众多由脂质组成的生物膜结构如线粒体等并无自身合成脂质的能力, 因而脂质必然要从其合成之处转运到其他细胞器如线粒体、叶绿体等^[1,2]。在研究脂质的转运过程中发现了脂质转运蛋白 (lipid transfer protein, LTP)。其基本特点是在离体条件下能在生物膜之间转运磷脂 (phospholipids), 并能与脂质结合^[2~4]。通过核磁共振及 X 射线衍射技术对其空间三维构象研究表明 LTP 的结构特点适于这一功能, 但目前 LTP 在生物膜之间转运脂质的能力并未得到体内实验的证实^[5,6]。近期对 LTP 基因的表达研究表明 LTP 的这一细胞内转运脂质的功能可能不存在, 而是参与了细胞外的一些作用^[4,5]。本文主要对 LTP 的生化特性及生物学功能和 LTP 基因的克隆与表达作一简要介绍。

1 LTP 的生化特点、活性分析和分离纯化

脂质转运蛋白已从玉米幼苗、菠菜叶、蓖麻中纯化^[7~9], 分子质量在 9~10 ku, 但在大麦和小麦中也发现有较短 (7 ku) 的 LTP, 动物和酵母中则存在较大 (11~35 ku) 的 LTP^[2,3]。多数 LTP 的等电点介于 8.8~10, 属碱性蛋白质。是植物可溶性蛋白中相对很丰富的一类蛋白, LTP 占玉米幼苗可溶性蛋白的约 4%^[10]。能与磷脂较特异地结合, 并能在不同的生物膜间转运磷脂如磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰肌醇 (PI) 等, 但它不能转运半

乳糖脂 (galactolipid)、硫脂 (sulfolipid) 及三酰甘油 (triacylglycerol) 等^[5]。植物的 LTP 是一类很稳定的蛋白, 在 4℃ 下存放数月后仍有活性, 95℃ 加热 5 min 后仍保持有转运脂质的活性, 这与其具有 4 个二硫键有关^[3]。

LTP 的转运脂质活性测定较为复杂^[3,7,8], 它需要两种生物膜, 即供体膜 (donor) 和受体膜 (acceptor)。供体膜一般选用放射标记或荧光标记的磷脂经超声波处理形成的脂质体 (liposome), 受体膜则多选用线粒体或其他能通过离心与脂质体分开的亚细胞成分。通过将受体膜与供体膜共培养后再将它们分离, 测定受体膜中放射标记或荧光标记的磷脂含量来表示 LTP 转移脂质的能力。在缺 LTP 时, 生物膜间的磷脂转移效率非常低或没有。在动植物 LTP 转运脂质的实验中, 都发现磷脂在供体膜与受体膜之间的双向交流, 因而又将 LTP 称为磷脂交换蛋白 (phospholipid exchange protein, PLEP), 但现在公认的命名仍为 LTP^[3,4,7]。

因为 LTP 是一类小分子的碱性蛋白质, 这种蛋白质的分离与纯化是基于其生化特征进行的。通过凝胶分子筛、离子交换层析、反向高压液相色谱等技术进行分离^[2,3,8]。在纯化过程中的 LTP 活性监测发现有多峰 LTP 转脂活性峰的出现, 表明在植物中存在同工酶成分^[3]。

2 LTP 的结构与功能模式

玉米、小麦、蓖麻和水稻 LTP 的一级结构

* 广东省自然科学基金资助项目 (984012)。

Tel: (020) 87705626-404, E-mail: zhangmy@scib.ac.cn

收稿日期: 1999-04-08, 修回日期: 1999-08-16

(氨基酸序列) 已经测定^[3,6,11], 另有一些植物的 LTP 的一级结构也通过其 cDNA 序列推导而得. 由 91~95 个氨基酸残基所组成, 具一 21~27 个氨基酸残基的信号肽, 包含 8 个高度保守的半胱氨酸残基组成 4 个二硫桥. 其一级结构在不同物种的同源性相差较大, 植物 LTP 氨基酸序列的同源性在 30%~70% 之间^[11]. 尽管存在这种多态性, 但它们都具有 LTP 蛋白的结构特点和特性^[3,4,11].

X 射线晶体衍射和核磁共振 (NMR) 研究 LTP 的三维结构, 已绘制出 LTP 的三维结构图^[4,7,12]. 这两种方法皆以玉米 LTP 为基础, 它含 93 个氨基酸残基, 构成 4 个 α 螺旋 (α -helices) 和一个 C 端, 由 4 个二硫键所稳定, 并具一个内陷的疏水腔 (hydrophobic cavity), LTP 运输磷脂分子时就是磷脂分子的疏水脂肪链尾嵌入 LTP 的疏水腔内. NMR 的研究表明, LTP 分子的疏水腔足以容下整个磷脂分子, 但 X 射线晶体衍射研究结果表明只有酰基链插入 LTP 分子的疏水腔. 且一些特异的 LTP 如酰基辅酶 A 结合蛋白 (acyl-CoA-binding protein, ACBP) 的三维空间结构也与 LTP 相似^[13].

然而 LTP 怎样在膜之间进行磷脂转运呢? 现在比较公认的模式是 LTP 与磷脂形成 LTP-磷脂复合物^[3]. LTP 对酰基链的强烈结合作用, 及 LTP 空间结构已表明有一疏水腔, LTP 正好以其疏水腔容纳磷脂分子的一个酰基链, 而不是整个磷脂分子^[12]. 磷脂分子的两个酰基链同 LTP 的作用是一个强一个弱, 这有利于当 LTP 携带磷脂分子到达膜表面时, 进行磷脂的交换. 然而用二硫苏糖醇处理将 LTP 的 α 螺旋从 40% 降至 25% 时, 则玉米的 LTP 转脂活性被抑制, 表明 LTP 的二硫键对维持其活性的重要性; 加入 NaCl 等离子化合物也可抑制 LTP 活性, 这表明 LTP 与生物膜间的静电平衡对维持 LTP 活性也很重要^[3]. 且其活性具 Ca^{2+} 依赖性^[3].

3 LTP 基因的克隆与表达

编码 LTP 的基因或 cDNA 已从菠菜、蕃茄、大麦、胡萝卜、拟南芥菜等中克隆^[14~19], 大约有超过 100 个编码与 LTP 类似的表达末端 (expressed sequence tag, EST) 被确认. 这些 EST 都被归于一类暂时的同源序列, 其序列可通过互联网 (<http://www.tigr.org>) 获取^[5]. 但目前仍有待确认它们是否都具有 LTP 基因的功能. DNA 印

迹分析表明棉花、玉米、水稻等都存在 LTP 基因的多个拷贝, 并分布在不同的染色体上^[2,3,5].

LTP 基因的表达有较强的发育和组织特异性, 不同物种的 LTP 基因的表达特点不尽相同^[19]. 但多数材料的营养器官的表达研究表明, 根中常无 LTP 基因的表达, 而幼嫩组织比老化组织中表达要强, 且在幼花序中有强列的表达^[2,3,15,17]. 原位杂交表明玉米幼苗、胡萝卜胚的 LTP 基因仅仅在表皮细胞中表达, 具有较强的细胞类型特异性^[18]. 而油菜 LTP 基因则在所有的上胚轴中皆有表达, 而另一种 LTP 基因则在油菜的绒毡层细胞中表达^[19]. 原位杂交实验也证明拟南芥菜的 AtLTP1 基因与胚的起源相联系, 主要在表皮细胞中表达, 认为它可能与胚顶端组织的形成有关^[20]. 并通过转基因植物的方法, 将 LTP 基因的启动子同 GUS 基因结合, 研究 LTP 基因表达的特异性^[20].

LTP 的细胞内定位也较复杂, 免疫研究表明拟南芥菜、水稻、蓖麻的 LTP 存在于细胞壁上^[3~5,10,21]. 并发现 LTP 可能是一种分泌型蛋白, 带一个 21~27 个氨基酸残基的信号肽, 从而推论 LTP 在内质网中形成后全部进入内质网腔中, 经高尔基体分泌出细胞外, LTP 是一种胞外蛋白质^[14,22~24].

4 LTP 家族的生物学功能

LTP 在细胞内转运脂质的功能, 参与了生物膜的合成, 在前面已作描述. 但近期的研究则对其这一功能提出了疑问, 认为 LTP 可能参与了细胞外的一些功能.

LTP 的定位研究提供了 LTP 可将酰基单体转运到细胞外, 从而认为 LTP 参与了腊质 (wax) 和角质 (cutin) 的形成^[5]. 这一假设可从 LTP 是花椰菜叶表面腊质中一种主要的蛋白质^[25], 并且 LTP 基因主要在周边细胞及幼胚中表达得到证实. LTP 的向外分泌功能与体胚发生的联系可解释为它可能参与了幼胚外保护层的形成.

最近的研究还表明 LTP 参与了植物的抗病反应, 是一种植物的抗病蛋白. 纯化的植物 LTP 蛋白在体外可抑制细菌及真菌的生长^[5]. 从玉米、菠菜、花椰菜、拟南芥菜中分离的 LTP 蛋白都表现不同程度的抗病功能^[3,5,26]. 从大麦中分离的一种 LTP 蛋白还表现出受病原真菌的诱导表达. 然而, LTP 参与植物抗病的机制却不明确, 一种观点认为它可能作为一种极性蛋白质影响了真菌的细

胞膜。洋葱的一种抗病蛋白与 LTP 有同源性, 但它不表现在转运脂质的功能^[26]。

还有研究表明, LTP 的表达受环境因子影响, 如温度、盐和干旱胁迫可诱导 LTP 基因的表达^[19]。NaCl、甘露醇、脱落酸 (ABA) 处理蕃茄可诱导 LTP 基因在茎的表达, 大麦、棉花的 LTP 基因则可由低温和 ABA 诱导表达^[3~5, 27]。然而它们在逆境胁迫下的表达是否同植物的抗逆性有关则需进一步研究。目前 LTP 基因的表达调控则不明确。

5 特异 LTP 的研究

LTP 是一类专一性不强的转运磷脂的蛋白质, 对不同的磷脂皆具转运能力, 但细胞内还存在有对某类脂质有特异结合的蛋白。如最近发现了二类这样的蛋白质: 一是酰基辅酶 A 结合蛋白 (acyl-CoA-binding protein, ACBP)。已从拟南芥菜中纯化 ACBP, 它是具 92 个氨基酸残基, 等电点为 9 的碱性蛋白质, 能与酰基辅酶 A 特异结合, 但不同其他脂质及酰基结合。其基本特性与 LTP 相似, 但没有信号肽及 LTP 的 8 个保守的半胱氨酸残基, 是一细胞内蛋白。棉花、水稻、拟南芥菜的 ACBP 的 cDNA 已经克隆^[4, 28]。另一类特异脂质转运蛋白 (specific lipid transfer protein, spLTP), 是一类可溶的 LTP, 它们已在动物、酵母中发现。其中能特异地转运磷脂酰肌醇 (PI) 的称为 PI-TP (phosphatidylinositol-transfer protein); 能特异地转运磷脂酰胆碱 (PC) 的 LTP, 称为 PC-TP (phosphatidylcholine-transfer protein)^[4, 5]。

参 考 文 献

- Browse J, Somerville C. Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 467~ 506
- Kader J-C. Lipid transport in plants. In: Moore TS, eds. *Lipid Metabolism in Plants*. New York: CRC Press, 1993. 309~ 336
- Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47**: 627~ 654
- Yamada M. Lipid transfer proteins in plants and microorganisms. *Plant Cell Physiol*, 1992, **33** (1): 1~ 6
- Kader J C. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science*, 1997, **2** (2): 66~ 70
- Desormeaux A, Blochet J E, Pezolet M, *et al.* Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy: role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the α -helix structure. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1121** (1~ 2): 137~ 152
- Wirtz K W A. Phospholipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*, 1991, **60**: 73~ 99
- Kader J-C, Julienne M, Vergnolle C. Purification and characterization a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *Eur J Biochem*, 1984, **139** (4): 411~ 416
- Watanabe S, Yamada M. Purification and characterization of a non-specific lipid transfer protein from germinated castor bean endosperm which transfer phospholipids and galactolipids. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **876** (1): 116~ 123
- Sossountzov L, Ruiz-Naval L, Vignols F, *et al.* Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 1991, **3** (8): 923~ 933
- Takishima K, Watanabe S, Yamada M, *et al.* Amino acid sequences of two nonspecific lipid-transfer protein from germinated castor bean. *Eur J Biochem*, 1988, **177** (2): 241~ 249
- Gomar J, Petit M C, Sodano P, *et al.* Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds. *Protein Sci*, 1996, **5** (4): 565~ 577
- Kragelund B B, Andersen K V, Madsen J C, *et al.* Three-dimensional structure of the complex between acyl-coenzyme A binding protein and palmitoyl-coenzyme A. *J Mol Biol*, 1993, **230** (4): 1260~ 1277
- Bernhard W R, Thoma S, Botella J, *et al.* Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. *Plant Physiol*, 1991, **95** (1): 164~ 170
- Fleming A J, Mandel T, Roth I, *et al.* The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem. *Plant Cell*, 1993, **5** (2): 297~ 309
- Gausig K. Lipid transfer protein genes specifically expressed in barley leaves and coleoptiles. *Planta*, 1994, **192** (4): 574~ 580
- Fleming A J, Kuhlemeier C. Activation of basal cells of the apical meristem during sepal formation in tomato. *Plant Cell*, 1994, **6** (5): 789~ 798
- Sterk P, Booij H, Schellekens G A, *et al.* Cell-specific expression of the carrot EP-2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 1991, **3** (3): 907~ 921
- Soufleri I A, Vergnolle C, Miginiac E, *et al.* Germination-specific lipid transfer protein cDNA in *Brassica napus* L.. *Planta*, 1996, **199** (2): 229~ 237
- Vroemen C W, Langeveld S, Mayer U, *et al.* Pattern formation in the *Arabidopsis* embryo revealed by position-specific lipid transfer protein gene expression. *Plant Cell*, 1996, **8** (5): 783~ 791
- Thoma S, Kaneto Y, Somerville C R. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *Plant J*, 1993, **3** (4): 427~ 436
- Tsuboi S, Suga T, Takishima K, *et al.* Organ-specific occurrence and expression of the isoforms of nonspecific lipid transfer protein in castor bean seedlings and molecular cloning of a full-length cDNA for a cotyledon-specific isoform. *J Biochem (Tokyo)*, 1991, **110** (5): 823~ 831
- Weig A, Komor E. The lipid-transfer protein C of *Ricinus communis* L.: isolation of two cDNA sequences which are strongly and exclusively expressed in cotyledons after germination. *Planta*, 1992, **187** (3): 367~ 371
- Plant A L, Cohen A, Moses M S, *et al.* Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought- and abscisic acid-induced

- gene of tomato. *Plant Physiol*, 1991, **97** (3): 900~ 906
- 25 Pyee J, Yu H, Kolattukudy P E. Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem Biophys*, 1994, **311** (2): 460~ 468
- 26 Cammue B P, Thevissen K, Hendriks M, *et al.* A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol*, 1995, **109** (2): 445 ~ 455
- 27 Torres-Schumann S, Godoy J A, Pintor-Toro J A. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol Biol*, 1992, **18** (5): 749~ 757
- 28 张明永, 徐是雄, Chye M L, 等. 一种水稻酰基辅酶 A 结合蛋白 cDNA 的鉴定. *植物生理学报*, 1999, **25** (4): 327~ 331
Zhang M Y, Xu S X, Chye M L, *et al.* *Acta Phytophysiological Sinica*, 1999, **25** (4): 327~ 331

Progress in the Studies of Lipid-transfer Protein.

ZHANG Ming-Yong, LIANG Cheng-Ye (*South China Institute of Botany, The Chinese Academy of*

Sciences, Guangzhou 510650, China).

Abstract Lipid-transfer proteins (LTPs) are a group of basic, small (9 ku) proteins which transfer lipids between biomembranes by *in vitro* assays. So they are thought to participate in the lipid transferring during biomembrane synthesis. Their purification, structure, gene expression and biological functions have been studied in various monocotyledonous and dicotyledonous plants. The latest studies found that they are secreted and located in the cell wall, and that it is suggested that plant LTPs are possibly related with cutin formation, defense reactions against phytopathogens and plant adaptation to various environmental stresses.

Key words lipid-transfer protein, lipid, plant

植物抗脱水胁迫的分子机制

熊 清 王伯初¹⁾ 段传人

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘要 主要介绍植物在脱水胁迫下, 逆激基因产物的功能和胁迫信号的转导过程. 逆激基因产物的功能可分为两类: 一类起“保护”作用, 另一类起“调节”作用. 在脱水胁迫起始信号和基因表达之间至少存在四条信号转导通路, 两条依赖脱落酸 (ABA), 两条不依赖 ABA, 依赖 ABA 的途径中有 1 条必须有蛋白质合成. 不依赖 ABA 的途径中有 1 条与低温胁迫应答有共同的信号转导通路.

关键词 干旱, 盐渍, 低温, 脱水, 信号转导, 基因表达

学科分类号 Q756

植物在其生长过程中, 要受许多不良环境因素的影响. 为了适应环境, 在长期的进化中, 植物已逐渐建立起适应和抗性机制. 如干旱、盐渍、低温等外界因子引起的脱水胁迫 (water stress) 能使植物体内产生一系列生理和生化变化, 并诱导许多特殊基因进行表达, 这些逆激基因产物的功能及其表达调控, 近年来一直备受学术界的关注. 本文将主要介绍植物在脱水胁迫下, 逆激基因产物的功能以及胁迫信号转导和逆激基因表达调控方面的研究进展.

1 脱水胁迫诱导的逆激基因产物的功能

干旱、低温、盐渍等外界因子引起的脱水胁迫能够诱导植物体内的许多基因进行表达, 为了了解

这些基因表达产物在植物逆境应答中的作用, Shinozaki等通过差示筛选法和 PCR 法从拟南芥中克隆了 40 多个干旱诱导基因, 并将克隆到的基因序列与基因库里已知功能的序列相比较^[1~4], 经分析后认为, 脱水胁迫诱导基因产物的功能大致可分为两种类型^[3,5].

第一类是在植物的抗性中起作用的蛋白质. 这些蛋白质可细分为以下五种: 第一种是一类水通道蛋白, 如主要内在蛋白 (MIP) 等. 这类蛋白质可以形成选择性的水运输通道, 提高细胞膜的透水性, 便于水分摄入, 从而使脱水胁迫下的细胞保持

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (023) 65102507, E-mail: bio< bio@cqu.edu.cn

收稿日期: 1999-04-28, 修回日期: 1999-10-20